Genetische Differenzierung der Populationen des Alpenmurmeltieres *Marmota marmota* (Rodentia, Sciuridae): Untersuchungen mittels DNA-Fingerprinting und Mikrosatellitenanalyse

L. KRUCKENHAUSER, M. PRELEUTHNER, J. HERRERO & W. PINSKER

Abstract

Microsatellite-loci were employed as genetic markers to investigate the differentiation of 9 populations of the Alpine marmot (*Marmota m. marmota*) from Austria, Switzerland and Spain. Two different methods were used: multilocus-fingerprinting by means of restriction analysis and single-locus-fingerprinting by means of PCR amplification. The multilocus-fingerprinting results indicate a decrease of the genetic variation in the west-east direction. An exception is the allochthonous population from Turracher Nockberge. The data of 4 microsatellite reveal a more or less uniform variation pattern (average heterozygosity = 30%) in the autochthonous populations from Switzerland and western Austria. In contrast, the amount of variation differs considerably in the allochthonous populations. Whereas variation appears to be reduced in the populations Zillertaler Alpen and Kreuzeckgruppe, it is much higher in the population from Turracher Nockberge and even exceeds that of the autochthonous populations. The genetic relationships deduced from the allele frequencies show two distinct clusters: a homogenous group of 6 populations from the eastern Alps and a geographically heterogeneous group consisting of the allochthonous population from Berner Oberland as well as the non-autochthonous populations from the Turracher Nockberge and the Pyrenees. For these two latter populations the relationships obtained from the microsatellite loci and the occurrence of particular alleles suggest an origin of the founder individuals from the western Alps.

Stapfia 63,
zugleich Kataloge des OÖ. Landesmuseums,
Neue Folge Nr. 146 (1999), 149-158

Einleitung

Das Verbreitungsgebiet des Alpenmurmeltieres *Marmota m. marmota* umfaßt den gesamten Alpenbogen sowie einzelne Isolate außerhalb der Alpen, z. B. in den Pyrenäen (BIBIKOV 1996). Nur ein Teil dieser Populationen ist autochthonen Ursprungs. Andere Populationen hingegen, z. B. innerhalb Österreichs jene östlich des Wipptales, wurden durch Aussetzungen neu begründet (PRELEUTHNER 1993). Vom Blickpunkt des Genetikers aus gesehen ist diese Wiederbesiedelung nicht unproblematisch. Die Tatsache, daß für die einzelnen Aussetzungen jeweils nur relativ wenige Individuen verwendet wurden (PRELEUTHNER et al. 1995), führt zwangsläufig zu genetischer Verarmung, da bei jeder Neubegründung einer Population nur ein Teil der gesamten genetischen Vielfalt in den Gründerindividuen repräsentiert ist. Die restliche Variation geht somit verloren, auch wenn in weiterer Folge die Individuenzahl rasch ansteigt. Entscheidend für das Ausmaß des Variationsverlustes ist die Individuenzahl zum Zeitpunkt der geringsten Populationsgröße, ein Phänomen, das man als „Flaschenhalseffekt" bezeichnet.

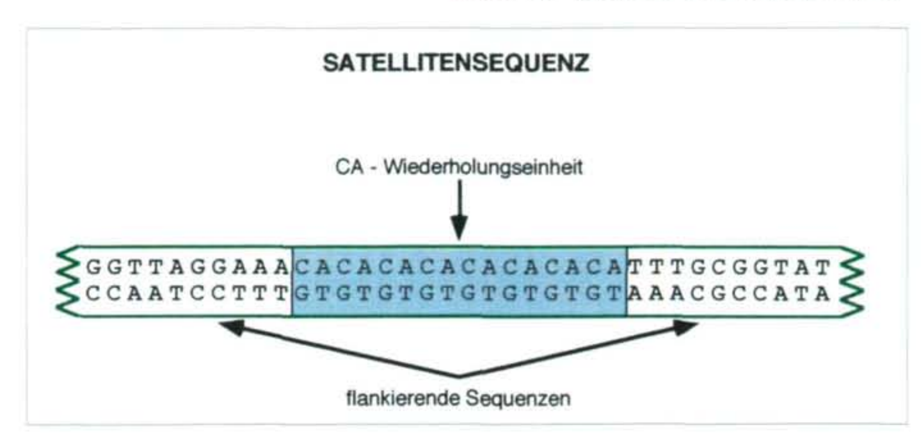


Abb. 1: Schematische Darstellung eines DNA-Mikrosatelliten. Der repetitive Abschnitt (blau) besteht in diesem Beispiel aus Wiederholungen der Sequenz CA (am komplementären Strang: TG). Die Anzahl der CA-Wiederholungseinheiten variiert zwischen den verschiedenen Allelen. Der Mikrosatellit wird von stärker konservierten nichtrepetitiven Sequenzabschnitten flankiert, in denen sich die für die Isolierung des Satelliten wichtigen Restriktionsschnittstellen bzw. Primerbindungsstellen befinden (siehe Abb. 2).

Nach so einem genetischen Flaschenhals kann neue Variation nur durch die natürliche Mutationsrate entstehen, ein sehr langsamer Vorgang, welcher mehrere Jahrtausende benötigt. Ein zusätzliches Problem ergibt sich aus dem Umstand, daß die für die Aussetzungen verwendeten Individuen oft aus allochthonen (nichtautochthonen) Populationen entstammten, was einen weiteren Verlust an genetischer Vielfalt zur Folge haben muß.

Wie Analysen der Enzymvariation mittels Proteinelektrophorese (ARNOLD 1990, PRELEUTHNER & PINSKER 1993) zeigen konnten, ist in den Murmeltierpopulationen aus dem östlichen Teil der Alpen die genetische Variation im Vergleich zu anderen Säugetierarten tatsächlich reduziert. Dies betrifft allerdings nicht nur die durch Aussetzung begründeten Populationen, sondern auch die autochthonen Populationen aus dem Westen Österreichs sowie aus Berchtesgaden. Die im Rahmen dieser Untersuchungen als genetische Marker eingesetzten Enzymgene konnten somit nur eine allgemein niedrigere Variation in den Untersuchungsgebieten feststellen. Weitere Analysen der Populationsdifferenzierung waren dagegen nicht möglich.

Bei den für die Enzymanalysen verwendeten Genen handelt es sich um sogenannte Strukturgene, in denen die mit Hilfe des genetischen Codes verschlüsselte Bauanleitung für die Enzymproteine gespeichert ist. Im Genom (der gesamten genetischen Information einer Zelle) von Säugetieren besteht jedoch nur ein kleiner Anteil aus Strukturgenen, der Rest hingegen aus nichtcodierenden Sequenzen, die keine Proteininformation enthalten. Innerhalb dieser nichtcodierenden DNA findet sich ein beträchtlicher Anteil ohne jede Funktion. Was die genetische Vielfalt anbelangt, so ist diese umso höher, je geringer die funktionelle Bedeutung des betreffenden DNA-Abschnittes ist. Bei Enzymgenen kann die Mutation an einer einzigen Position (z. B. Austausch oder Verlust einer Base) zum Ausfall des Enzyms und in weiterer Folge zur Beeinträchtigung des gesamten Organismus führen. Die natürliche Selektion sorgt daher dafür, daß solche Mutationen eliminiert oder zumindest auf einem geringen Häufigkeitsniveau gehalten werden. In den nichtcodierenden Abschnitten hingegen bleiben Mutationen oft ohne Auswirkung und werden dadurch auch nicht von der Selektion ausgelesen. Nichtcodierende Bereiche des Genoms zeigen somit eine wesentlich höhere Variabilität.

In nichtcodierenden Abschnitten finden sich oft repetitive Sequenzen, die aus mehrfach hintereinandergereihten Kopien einer bestimmten Basenfolge bestehen. Handelt es sich bei der Wiederholungseinheit um ein sehr kurzes Sequenzmotiv von 2-4 Basenpaaren (bp), so bezeichet man den repetitiven

Abschnitt als Mikrosatelliten. In Abb. 1 ist eine solche Satellitensequenz dargestellt. Sie besteht aus einer Abfolge der Wiederholungseinheit CA (TG am komplementären Gegenstrang) und ist von nichtrepetitiven Sequenzen flankiert. Die Zahl der Wiederholungseinheiten eines solchen Mikrosatelliten kann nun variieren, die verschiedenen Längenvarianten werden Allele genannt. Mutationen, die zum Verlust oder zur Addition von Wiederholungseinheiten führen, entstehen durch Ungenauigkeiten bei der vor jeder Zellteilung stattfindenden Verdoppelung der genetischen Information und sind sehr häufig. Mikrosatelliten gehören somit zu den variabelsten Abschnitten des Genoms (Hypervariabilität) und werden daher als genetische Marker für die verschiedensten Fragestellungen eingesetzt, unter anderem für Vaterschaftsanalysen oder zur Identifizierung von Straftätern.

Ausgehend von der Annahme einer generell erniedrigten genetischen Variation in *M. marmota* erschien es ratsam, die stärker variablen Mikrosatellitenloci als Markergene für Populationsanalysen zu verwenden. In *M. marmota* wurden Mikrosatellitenloci erstmals im Rahmen von soziobiologischen Projekten zur Vaterschaftsbestimmung innerhalb von Familiengruppen erprobt (RASSMANN et al. 1994, GOOSSENS et al. 1998). Eine weitergehende Analyse des Berchtesgadener Isolats ergab, daß die untersuchten Mikrosatellitenloci in der dort ansässigen Population zwar polymorph vorliegen, das durchschnittliche Ausmaß der Variation aber deutlich unter dem anderer vergleichbarer Säugetierarten liegt (RASSMANN et al. 1994). Das Ergebnis gab jedoch Anlaß zur Hoffnung, durch Isolation einer größeren Anzahl von Mikrosatellitenloci genügend Markierungsgene für detailliertere Populationsanalysen zu erhalten.

Methodik

Für die Untersuchungen wurden von insgesamt neun Populationen aus Österreich (A), der Schweiz (CH) und Spanien (E) Stichproben entnommen. Vier Populationen aus der Schweiz (CH) und Westösterreich (A) sind autochthon: Ab = Berner Oberland (CH), Ag = Graubünden (CH), B = Lechquellengebirge (A) und C = Verwallgruppe (A). Fünf Populationen sind auf Aussetzungen zurückzuführen: E = Zillertaler Alpen (A), H = Kreuzeckgruppe (A), J = Turracher Nockberge (A), M = Eisenerzer Alpen (A) und P = spanische Pyrenäen (E). Die geographische Herkunft der Stichproben aus den Alpen ist in Abb. 2 dargestellt. Die Stichprobe aus Spanien stammt teils aus Panticosa (Zentralpyrenäen), teils aus Echo (westliche Pyrenäen). Als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion wurde Lebergewebe verwendet.

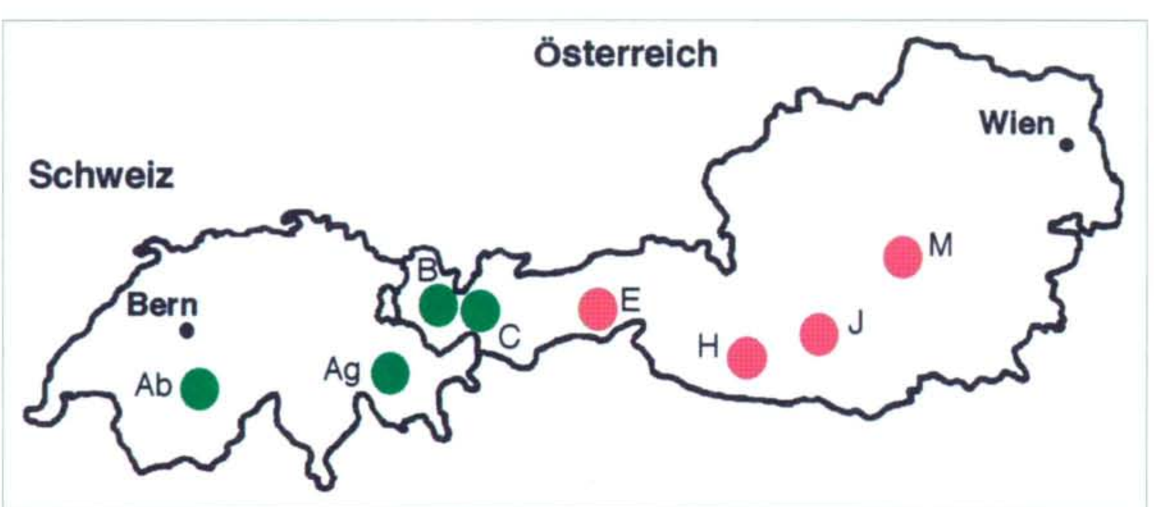


Abb. 2: Geographische Herkunft der untersuchten Murmeltiere. Es wurden 4 autochthone Populationen (grün) und 4 durch Wiedereinsetzung begründete Populationen (rot) analysiert.

Für die Untersuchung der Längenvariation müssen die Mikrosatellitenloci aus dem Genom isoliert werden. Dazu stehen grundsätzlich zwei Methoden zur Verfügung (Abb. 3):

1) Restriktionsanalyse. Restriktionsenzyme sind molekulare Werkzeuge der Gentechnik, mittels derer DNA-Moleküle an bestimmten Erkennungsstellen geschnitten

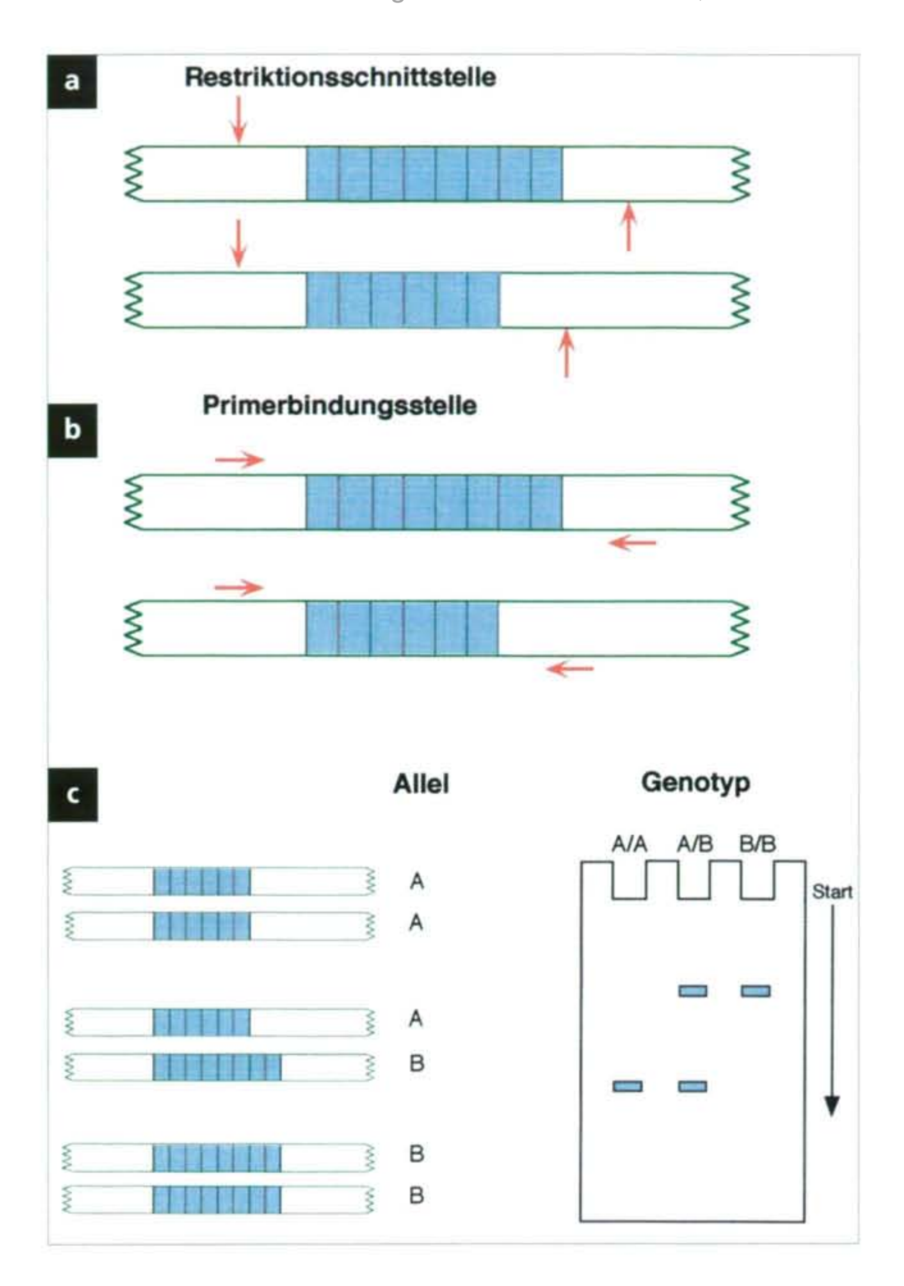


Abb. 3:
Entstehung unterschiedlich langer Fragmente durch Variation des Mikrosatelliten. Der variable Abschnitt (blau) kann beispielsweise mit Hilfe von Restriktionsenzymen (senkrechte Pfeile) herausgeschnitten werden (a). Eine andere Möglichkeit bietet der Einsatz von Primersequenzen (waagrechte Pfeile), die außerhalb der Mikrosatellitensequenz binden. In diesem Fall kann das dazwischenliegende Stück mittels PCR amplifiziert werden (b). Die so gewonnenen DNA-Fragmente können durch Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden (c). Die Fragmentmuster der einzelnen Individuen geben Auskunft über den jeweiligen Genotyp. Homozygote Individuen haben eine Bande, Heterozygote hingegen zwei Banden.

werden können. Bei diesen Erkennungsstellen handelt es sich um kurze Basenfolgen von 4-6 bp Länge. Jedes Enzym erkennt spezifisch eine ganz bestimmte Basenfolge als Zielsequenz und schneidet dort den DNA-Doppelstrang durch. Das für die vorliegenden Untersuchung verwendete Restriktionsenzym Hinf I erkennt beispielsweise die Zielsequenz GANTC (G, A, T und C stehen für die Basen Guanin, Adenin, Thymin und Cytosin, N für eine beliebige Base). Wichtig für die Untersuchung ist nun, daß die Zielsequenz des verwendeten Restriktionsenzyms nicht innerhalb des Mikrosatelliten, wohl aber in den links und rechts davon gelegenen flankierenden Regionen vorkommt. Schneidet man nun die DNA mit diesem Enzym, so erhält man das gesamte Fragment zwischen den beiden Schnittstellen bestehend aus dem Mikrosatelliten und den beiden flankierenden Regionen. Abhängig von der Zahl der Wiederholungseinheiten innerhalb des Mikrosatelliten variiert die Länge dieser Fragmente (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus = RFLP). Die Bestimmung der Länge erfolgt nun durch Auftrennung der Fragmente mittels Elektrophorese. Im elektrischen Spannungsfeld bewegen sich DNA-Moleküle infolge ihrer negativen Ladung vom Minus- zum Pluspol. Kurze Moleküle wandern dabei schneller als lange Moleküle, sodaß eine Auftrennung nach Größe möglich ist.

2) PCR-Amplifikation. Bei dieser Methode wird die Mikrosatellitensequenz mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Ausgangspunkt für die spezifische Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts sind sogenannte Primersequenzen, das sind kurze (etwa 20 bp) DNA-Moleküle, die sich an komplementäre Bindungsstellen im flankierenden Bereich des Mikrosatelliten anlagern. Von diesen Primern aus wird der dazwischenliegende Abschnitt mehrfach repliziert und auf diese Weise vervielfältigt. Die außerhalb der Primer gelegene DNA ist von diesem Replikationsprozeß ausgeschlossen. Auch die durch PCR erzeugten Fragmente können elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt werden, um die Längenvariation der Mikrosatelliten zu untersuchen.

Oft kommt eine bestimmte Mikrosatellitensequenz an mehreren Stellen des Genoms vor. Bei der Restriktionsanalyse erhält man dann von jeder dieser Positionen ein Fragment, wodurch nach der elektrophoretischen Auftrennung sehr komplexe Bandenmuster entstehen. Diese Bandenmuster sind wegen der vielen möglichen Fragmentkombinationen oft individuenspezifisch, weshalb man sie auch gerne als „genetischen Fingerabdruck" bezeichnet. Da es sich bei den Fragmenten um Produkte mehrerer Loci (Positionen im Genom) handelt, spricht man daher auch von Multilocus-DNA-Fingerprinting. Es ist dabei allerdings sehr schwierig oder in vielen Fällen sogar unmöglich herauszufinden, welches Fragment welchem Locus zuzuordnen ist bzw.

wieviele Loci überhaupt beteiligt sind. Eine eindeutige genetische Interpretation der Bandenmuster ist daher selten durchführbar. Trotzdem kann man aus den so gewonnenen Daten die genetischen Unterschiede sowohl zwischen Individuen als auch zwischen Populationen quantifizieren. Eine dafür verwendete Methode ist die Berechnung des APD-Wertes (= average percentage difference) nach YUHKI & O'BRIEN (1990). Dabei werden zuerst in paarweisen Vergleichen zwischen den einzelnen Individuen genetische Differenzwerte bestimmt, indem man die Zahl der zwischen den Individuen verschiedenen Banden durch die Gesamtzahl der in beiden Individuen beobachteten Banden teilt. Aus diesen Zahlen erhält man dann Mittelwerte für:

1) Vergleiche innerhalb einer Population als Maß für deren genetische Variation.

2) Vergleiche zwischen Populationen als Maß für deren genetische Divergenz.

Bei der PCR-Amplifikation wird durch die Verwendung der hochspezifischen Primer jeweils nur ein bestimmter Locus erfaßt. Man spricht deshalb auch von „Single-Locus-Fingerprinting". Die genetische Interpretation der Bandenmuster ist daher einfach. Pro Locus und Individuum erhält man entweder nur ein Fragment (von homozygoten Individuen) oder zwei Fragmente (von heterozygoten Individuen). Ein weiterer Vorteil der PCR-Technik liegt darin, daß man mit sehr geringen Materialmengen auskommt, da die zu untersuchende Zielsequenz ja amplifiziert wird. Es können daher nichtinvasive Methoden der Materialgewinnung zur Anwendung kommen (z. B. DNA-Extraktion aus Haaren), was besonders bei der Untersuchung geschützter Populationen wichtig ist.

Aufwendig im Vergleich zur Restriktionsanalyse sind bei der PCR-Amplifikation die Vorarbeiten, nämlich das Auffinden, Isolieren und Charakterisieren eines Mikrosatellitenlocus. Aus der Gesamt-DNA des Murmeltieres muß eine Genbank erstellt werden. Dabei wird das Genom in zahlreiche Fragmente zerlegt und in Vektoren kloniert. Aus diesen Klonen werden solche ausgesondert, die eine bestimmte Satellitensequenz enthalten. Diese müssen dann sequenziert werden und auf der Basis der so erhaltenen DNA-Sequenz können spezifische Primer für die den Mikrosatelliten flankierenden Regionen konstruiert werden.

Ergebnisse und Diskussion

Multilocus-Fingerprinting

Beim Multilocus-Fingerprinting mittels Restriktionsanalyse wurden Loci erfaßt, die die Satellitensequenz ATCC enthalten. Elf verschiedene Fragmentgrößen im Bereich zwischen 4 bis 26 kb (1 Kilobase = 1000 bp) wurden beobachtet (Abb. 4), die von vier verschiedenen Mikrosatellitenloci stammen. Sechs dieser Banden repräsentieren verschiedene Allele eines einzigen, als L-I bezeichneten Locus (KRUCKENHAUSER 1995, KRUCKENHAUSER et al. 1997). Für die übrigen fünf Banden war jedoch eine eindeutige Zuordnung zu den drei verbleibenden Loci aufgrund der Populationsdaten nicht möglich. Für eine exakte genetische Interpretation wären Familienanalysen mit gesicherter Elternschaft notwendig.

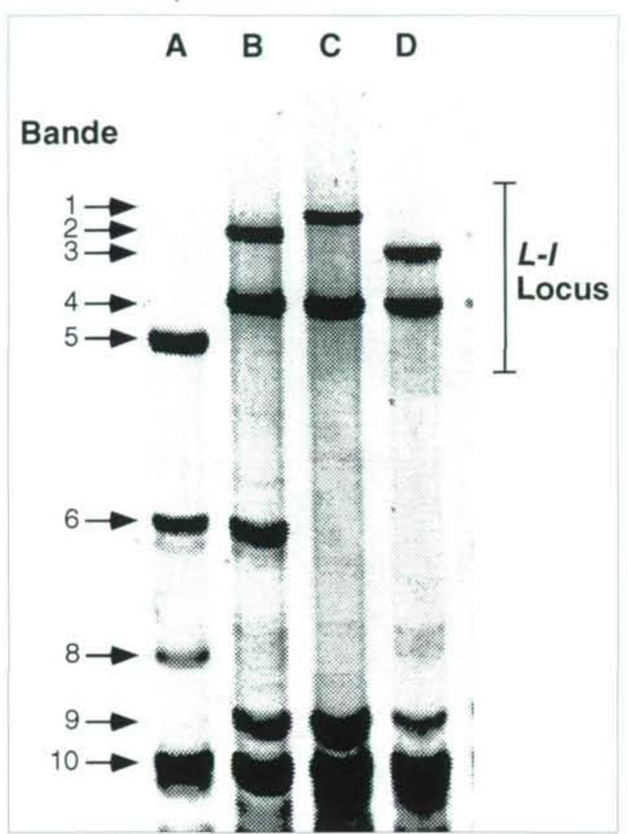


Abb. 4: Multilocus-Fingerprint. Hierbei werden mehrere, die gleiche Mikrosatellitensequenz enthaltende Loci gleichzeitig erfaßt. Für jedes Individuum entsteht ein komplexes Fragmentmuster und die vier hier untersuchten Murmeltiere sind klar voneinander zu unterscheiden. Die Zugehörigkeit der Banden (1-10) zu einem bestimmten Locus ist allerdings schwierig, was eine genaue Bestimmung des Genotyps ausschließt. Weitergehende Analysen ergaben, daß die Banden 1-5 einem einzigen Locus (L-I) zuzuordnen sind, für die übrigen Banden (6-10) war eine eindeutige genetische Interpretation nicht möglich. In den vier hier untersuchten Individuen sind fünf verschiedene Allele des L-I Locus vertreten. Die L-I Genotypen der vier Individuen wären wie folgt: A = 5/5 (homozygot für Allel 5), B = 2/4 (heterozygot für die Allele 2 und 4), C = 1/4 (heterozygot für die Allele 1 und 4), D = 3/4 (heterozygot für die Allele 3 und 4).

Die Ergebnisse des Multilocus-Fingerprinting zeigen, daß alle Populationen an den mit dieser Methode erfaßten Loci genetisch varia-

bel sind. Die Bandenmuster sind jedoch nicht individuenspezifisch, wie dies bei einem Fingerabdruck der Fall wäre. Dieses Fehlen von Hypervariabilität kann als indirekter Hinweis auf reduzierte Variation betrachtet werden, wie sie aufgrund der Ergebnisse der Allozymuntersuchungen (PRELEUTHNER & PINSKER 1993) für das Alpenmurmeltieres vermutet wird. Das Ausmaß der Variation in den einzelnen Populationen kann anhand der APD-Werte verglichen werden (Abb. 5). Der höchste APD-Wert findet sich in der allochthonen Population P aus den Pyrenäen. Hohe Werte zeigen auch die beiden autochthonen Populationen Ab und Ag aus der Schweiz, also dem zentralen Kernbereich der Murmeltiervorkommen in den Alpen. Nach Osten hin zeigt sich eine Abnahme der Variation, welche bereits in den beiden autochthonen Populationen B und C aus dem Westen Österreichs festzustellen ist. Eine Ausnahme bildet dabei Population J aus den Turracher Nockbergen. Obwohl es sich hier um eine durch Aussetzung begründete Population handelt, liegt der APD-Wert im Bereich der Populationen aus der Schweiz.

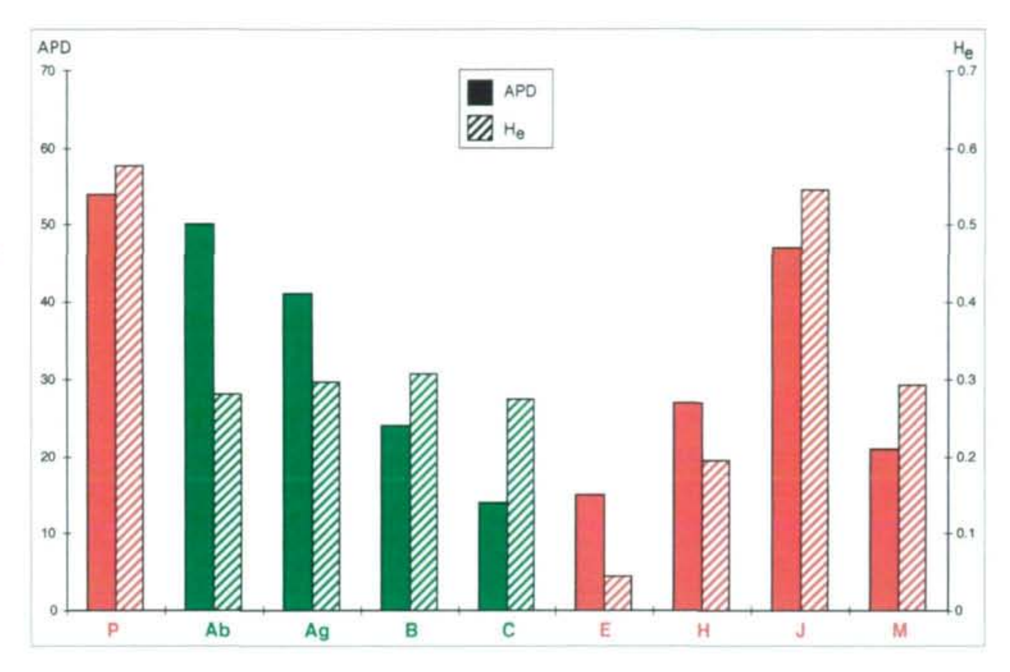


Abb. 5:
Vergleich der genetischen Variation. Die APD-Werte stammen aus der Multilocus-Mikrosatellitenanalyse, die H_e-Werte aus der Single-Locus-Mikrosatellitenanalyse. Die Probengebiete sind nach ihrer geographischen Herkunft von Westen nach Osten gereiht. *Grün = autochthone Populationen, rot* = durch Aussetzungen begründete Populationen.

Wenn man die vom Locus L-I stammenden Fragmente getrennt auswertet, so ist es möglich, die Häufigkeiten der einzelnen Allele in den verschiedenen Populationen zu bestimmen (Tab. 1). Beim Vergleich dieser Häufigkeiten wird der Grad der Differenzierung sichtbar. Auffällig ist, daß in Population P aus den Pyrenäen alle 6 für diesen Locus beobachteten Allele vorkommen. In Population J (Turracher Nockberge) sind 5 Allele vorhanden, wobei die Allele 1 und 4 in den Stichproben aus den österreichischen Populationen fehlen, dafür aber in der Schweiz (Ab, Ag) und in den Pyrenäen (P) vorkommen. Da es sich bei J um eine durch Aussetzung begründete Population handelt, kann das Auftreten dieser Allele als Hinweis auf einen Ursprung der Gründerindividuen aus einer schweizerischen Population betrachtet werden.

Single-Locus-Mikrosatelliten

Weitere Hinweise für diese Hypothese liefern die Daten der Single-Locus-Mikrosatellitenanalyse. Insgesamt 12 polymorphe Loci wurden bis dato entdeckt, drei davon (die Loci MS06, MS41 und MS45) wurden bereits in allen 9 Testpopulationen untersucht. Als Beispiel ist das Fragmentmuster des Locus MS45 in Abb. 6 dargestellt. Im Gegensatz zum Multilocus-Fingerprinting (Abb. 4) ist hier die Zuordnung der Genotypen eindeutig. 13 verschiedene Allele konnten an den 3 Loci unterschieden werden, Locus MS06 zeigte mit 6 Allelen die höchste Variabilität. Die Häufigkeiten der Allele in den 9 Testpopulationen sind in Tab. 1 zusammengestellt. Überraschenderweise zeigen die beiden allochthonen

Populationen P aus den Pyrenäen und J aus den Turracher Nockbergen die höchste Vielfalt an unterschiedlichen Allelen (jeweils 10 der insgesamt 13 beobachteten Allele), ein Ergebnis, welches gut mit den Daten des L-I Locus übereinstimmt. In Population J treten Allele auf, die in den restlichen österreichischen Stichproben nicht gefunden wurden, dafür aber in den Populationen aus der Schweiz bzw. den Pyrenäen vorkommen: die Allele 156, 162 und 164 des MS06 Locus sowie Allel 109 des MS45 Locus.

Aus den Allelhäufigkeiten läßt sich der durchschnittliche Heterozygotiegrad (H_e) als nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteter Heterozygotenanteil berechnen. Der Heterozygotiegrad wird so wie die APD-Werte beim Multilocus-Fingerprinting (siehe oben) als Maß für die genetische Variation verwendet. In Abb. 5 sind Heterozygotiegrad und APD-Werte der 9 Populationen gegenübergestellt. Den höchsten Heterozygotiegrad findet man in den beiden allochtthonen Populationen P (Pyrenäen) und J (Turracher Nockberge), ein Ergebnis, das gut mit den hohen APD-Werten korreliert. In den 4 autochthonen Populationen aus der Schweiz (Ab, Ag) und Österreich ist der Heterozygotiegrad etwa gleich hoch (30%). Dieser Wert wird auch in der wiedereingebürgerten Population M (Eisenerzer Alpen) erreicht, in den beiden restlichen allochthonen Populationen ist hingegen die Variation niedriger (E: 4,5%, H: 19,7%).

Um den genetischen Verwandtschaftsgrad zwischen den Populationen zu bestimmen, werden die Allelhäufigkeiten paarweise zwischen sämtlichen Stichproben verglichen und für jeden Vergleich ein Distanzwert (D) berechnet (NEI 1972). Als Grundlage wurden die Ergebnisse von 4 Loci (Tab. 1) herangezogen: Locus L-I aus der Multilocus-Fingerprint-Analyse und die Mikrosatellitenloci MS06, MS41 und MS45. Aus diesen Distanzwerten wiederum wurde ein Dendrogramm nach der UPGMA-Methode (SNEATH & SOKAL 1973) erstellt (Abb. 7). Im Dendrogramm sind zwei distinkte Gruppen klar erkennbar. Die größere Gruppe umfaßt alle Stichproben aus den Ostalpen, von Graubünden (Ag) bis Eisenerzer Alpen (M), wobei die Distanzwerte innerhalb dieser Gruppe sehr niedrig sind (tiefste Gabelung bei 0,13). Die zweite Gruppe ist geographisch heterogen und setzt sich aus der autochthonen Population aus dem Berner Oberland sowie den nichtautochthonen Populationen aus den Pyrenäen und den Turracher Nockbergen zusammen. Innerhalb dieser Gruppe sind die Distanzwerte wesentlich höher (tiefste Gabelung bei 0,47).

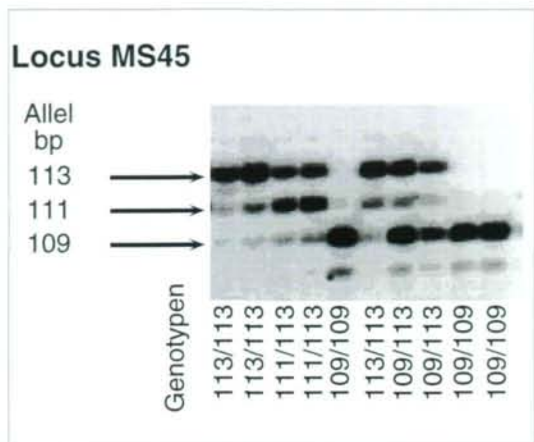


Abb. 6:
Single-Locus-Fragmentmuster. Untersucht wurde der Mikrosatellitenlocus MS45. In den 10 Individuen sind 3 verschiedene Allele erkennbar, die nach der Länge ihrer PCR-Fragmente (in bp) mit den Zahlen 109, 111 und 113 bezeichnet sind. Die Allele treten in unterschiedlichen Kombinationen (Genotypen) auf: die homozygoten (jeweils 1 Hauptbande) Genotypen 109/113 und 113/113 sowie die heterozygoten (jeweils 2 Hauptbanden) Genotypen 109/113 und 111/113 sind unter den 10 gezeigten Individuen zu erkennen. Zusätzliche, durch schwächere Banden repräsentierte Fragmente (Stotterbanden) entstehen durch Mutationen der Satellitensequenz während der PCR-Amplifikation und werden bei der Bestimmung der Genotypen nicht berücksichtigt.

Schlußfolgerungen

Welche konkreten Aussagen über die Differenzierung der Populationen des Alpenmurmeltieres lassen sich nun aufgrund dieser Ergebnisse machen? Eine wichtige Frage war das Ausmaß der genetischen Variation, vor allem in Hinblick auf eine mögliche genetische Verarmung der allochthonen Populationen. Wie die Untersuchung gezeigt hat, ist die durchschnittliche Variabilität der Mikrosatellitenloci in den autochthonen Populationen eher gleichmäßig verteilt, wobei allerdings die APD-Werte aus den Multilocus-Fingerprintdaten eine Abnahme von Westen nach Osten hin andeuten. Letzteres würde mit den Ergebnissen aus Allozymanalysen übereinstimmen (siehe Beiträge „Genetische Verarmung des Alpenmurmeltieres *Marmota m. marmota* in Österreich" und „Das Alpenmurmeltier *Marmota m. marmota* – eine genetisch verarmte Tierart?"). Bei den allochthonen Populationen differiert das Ausmaß der Variation zwischen den einzelnen Populationen beträchtlich. Hinweise auf reduzierte Variation ergeben sich für die Population E (Zillertaler Alpen) und eventuell (auf der Basis der

APD-Werte) für Population H (Kreuzeckgruppe).

Ein einheitlicher Trend in Richtung genetischer Verarmung ist jedoch nicht zu beobachten. Im Gegenteil, in den allochthonen Populationen der Pyrenäen bzw. der Turracher Nockberge ist die Variation sogar deutlich höher als in den autochthonen Populationen, ein Befund der in krassem Widerspruch zu den Erwartungen (Founder-Effekt, genetischer Flaschenhals) steht. Wie kann es in einer durch Aussetzungen vor nicht allzu langer Zeit entstandenen Population zu einer derart hohen Variation kommen? Die Ursachen sind wohl im geographischen Ursprung der Founderindividuen oder auch in den näheren Umstanden der Aussetzungen zu suchen. Als Stammpopulation kommt entweder eine stark variable Population in Frage oder mehrere Aussetzungen von Individuen unterschiedlicher Herkunft. Wie unsere Untersuchungen ergeben haben, ist unter den autochthonen Populationen die Variation in der Stichprobe aus dem Berner Oberland (Ab) am höchsten. Ein Import der Founderindividuen aus einem Gebiet der Westalpen wäre somit wahrscheinlich. Im Falle der Population aus den Turracher Nockbergen (J) spricht für diese Hypothese auch das Auftreten bestimmter Allele (siehe oben), die nur in den Stichproben aus der Schweiz, nicht aber in jenen aus Österreich vorkommen. Als weiteres Indiz für einen westalpinen Ursprung wäre ein Ergebnis der Allozymuntersuchungen zu werten. Der Sod-1 Locus ist in Population J monomorph für das Allel F (siehe Beitrag „Genetische Verarmung des Alpenmurmeltieres *Marmota m. marmota* in Österreich"). Die Untersuchung von zugegebenermaßen nur wenigen Individuen aus Population Ab (N = 8) ergab dort ebenfalls Homozygotie für das F Allel. Schließlich weist die aus den Allelhäufigkeiten errechnete genetische Distanz auf eine nähere Verwandtschaft zwischen den Populationen J und Ab hin (Abb. 7). Unter den 119 dokumentierten Murmeltieraussetzungen in Österreich (PRELEUTHNER 1993) könnten 6 zum Genpool der Population J beigetragen haben. Zwei davon erfolgten innerhalb des Gebietes, bei den übrigen war die Herkunft der Founder-Individuen nicht rekonstruierbar. In Ermangelung anderer Informationen liefern die genetischen Daten somit den einzigen Hinweis auf den Ursprung dieser Population, welcher höchstwahrscheinlich in den Westalpen, möglicherweise sogar im Berner Oberland zu suchen ist. Eine andere Erklärung für den Sonderstatus dieser Population bietet die Vermutung, daß in dieser Region ein autochthoner Bestand überlebt haben könnte, welcher sich mit den neueingesetzten Individuen vermischte. Auch auf diese Weise könnte eine hochvariable Population entstanden sein, was aber einen Genfluß durch Aussetzungen aus westalpinen Populationen nicht ausschließen würde.

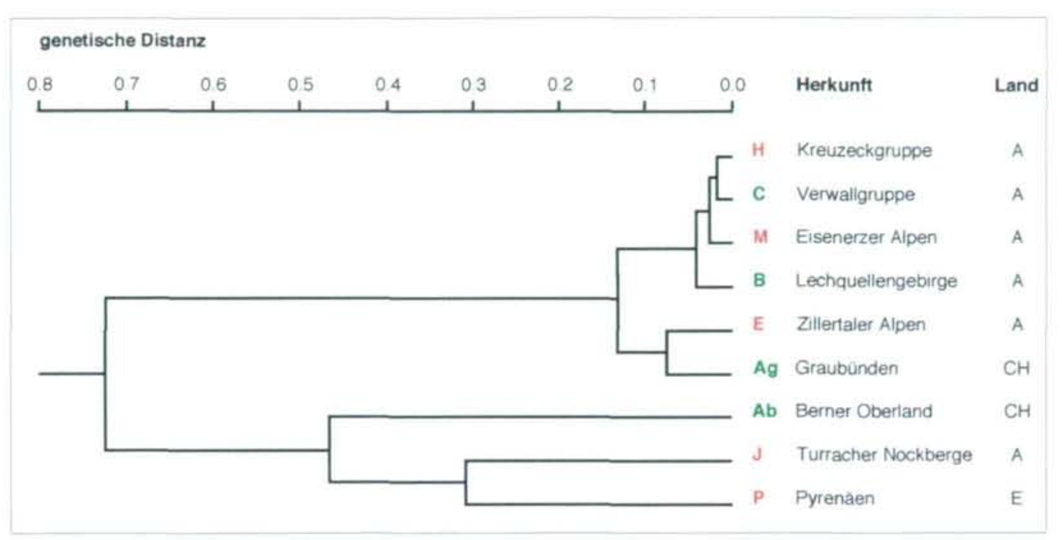


Abb. 7:
Genetische Verwandtschaft der Murmeltierpopulationen. Aus den Allelhäufigkeiten der 4 Mikrosatellitenloci L-I, MS06, MS41 und MS45 wurden in paarweisen Vergleichen genetische Distanzwerte berechnet und aus diesen ein UPGMA-Dendrogramm erstellt. Zwei Gruppen sind klar getrennt: Eine Gruppe von 6 eng verwandten östlichen Populationen (von Graubünden bis Eisenerzer Alpen) und eine geographisch heterogene Gruppe, welche die autochthone Population aus dem Berner Oberland sowie die nichtautochthonen Populationen aus den Pyrenäen und den Turracher Nockbergen umfaßt (grün = autochthon, rot = wiedereingebürgert).

Bei Population P (Pyrenäen) ist die Situation ähnlich. Auch hier weisen die genetische Verwandtschaft sowie das Vorkommen bestimmter Allele auf einen westalpinen Ursprung hin. Im Falle der Pyrenäen haben

allerdings nachgewiesenermaßen mehrere Aussetzungen mit Individuen aus verschiedenen Regionen der Alpen, vor allem aus Frankreich stattgefunden. Dies würde auch die hohe genetische Variation erklären und zeigen, daß die Neubegründung einer Population nicht zwangsläufig zu genetischer Verarmung führen muß.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom FWF im Rahmen des Projektes P11840-GEN gefördert. Zusätzlich unterstützt wurde die Arbeit durch das Institut für Wildbiologie und Jagdwirtschaft an der Universität für Bodenkultur Wien (Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. GOSSOW). Unser besonderer Dank gilt P. PARIZEK für ausgezeichnete technische Mitarbeit.

Zusammenfassung

Mikrosatelliten-Loci wurden als genetische Marker eingesetzt, um die Differenzierung von 9 Populationen des Alpenmurmeltieres (*Marmota m. marmota*) aus Österreich, der Schweiz und Spanien zu analysieren. Zwei unterschiedliche Methoden kamen zur Anwendung: Multilocus-Fingerprinting mittels Restriktionsanalyse und Single-Locus-Fingerprinting mittels PCR-Amplifikation. Die Ergebnisse des Multilocus-Fingerprinting deuten auf eine Abnahme der genetischen Variation in der West-Ost-Richtung hin. Eine Ausnahme bildet dabei die allochthone Population aus den Turracher Nockbergen. Die Auswertung der Daten von 4 Mikrosatellitenloci zeigt eine etwa gleich hohe Variation (Heterozygotiegrad 30%) in den allochthonen Populationen aus der Schweiz und Westösterreich. In den nichtautochthonen Populationen hingegen variiert das Ausmaß der Variation beträchtlich. Während in den Populationen Zillertaler Alpen und Kreuzeckgruppe die Variation reduziert erscheint, ist sie in den Populationen aus den Turracher Nockbergen sogar höher als in den autochthonen Populationen. Eine aus den Allelhäufigkeiten abgeleitete Analyse der genetischen Verwandtschaft zeigt zwei distinkte Gruppen auf: eine homogene Gruppe von 6 ostalpinen Populationen und eine geographisch heterogene Gruppe bestehend aus der autochthonen Population Berner Oberland sowie den allochthonen Populationen aus den Turracher Nockbergen und den Pyrenäen. Für die beiden letztgenannten Populationen weisen die aus den Mikrosatellitendaten errechneten Verwandtschaftsverhältnisse sowie das Vorkommen bestimmter Allele auf eine Herkunft der Founder-Individuen aus den Westalpen hin.

Tab. 1:
Mikrosatellitenvariation des Alpenmurmeltieres. Die Allelhäufigkeiten an den Loci L-I, MS06, MS41 und MS45 sind in % angegeben. (a = autochthon, na = nichtautochthon, 2n = Źahl der getesteten Allele)

Herkunftsland		E	CH	CH	A	A	A	A	A	A
Status		na	a	a	a	a	na	na	na	na
Population		**P**	**Ab**	**Ag**	**B**	**C**	**E**	**H**	**J**	**M**
Locus	**Allel**									
L-I	1	12.5	20.0	—	—	—	—	—	10.0	—
	2	18.7	20.0	9.1	—	3.3	—	—	15.0	—
	3	6.3	—	4.5	—	3.3	—	—	30.0	35.0
	4	6.3	40.0	4.5	—	—	—	—	30.0	—
	5	43.7	20.0	81.8	100.0	93.3	100.0	100.0	15.0	65.0
	6	12.5	—	—	—	—	—	—	—	—
	2n	16	10	22	32	30	32	32	20	20
MS06	142	12.5	75.0	11.1	—	—	—	—	—	—
	156	37.5	—	—	—	—	—	—	7.7	—
	158	18.7	—	—	—	—	—	—	—	—
	160	18.7	—	88.9	100.0	100.0	100.0	100.0	50.0	100.0
	162	12.5	—	—	—	—	—	—	7.7	—
	164	—	25.0	—	—	—	—	—	34.6	—
MS41	184	18.7	—	—	—	—	—	—	—	—
	186	62.6	100.0	88.9	30.6	45.8	92.8	63.3	76.9	50.0
	188	18.7	—	—	—	—	3.6	—	19.2	—
	190	—	—	11.1	69.4	54.2	3.6	36.7	3.9	50.0
MS45	109	31.2	62.5	11.1	—	—	—	—	38.5	—
	111	68.8	—	22.2	50.0	20.8	—	6.7	38.5	25.0
	113	—	37.5	66.7	50.0	79.2	100.0	93.3	23.0	75.0
	2n	20	8	16	18	36	24	28	30	26

Tab. 1:
Mikrosatellitenvariation des Alpenmurmeltieres. Die Allelhäufigkeiten an den Loci L-I, MS06, MS41 und MS45 sind in % angegeben. (a = autochthon, na = nichtautochthon, 2n = Tahl der getesteten Allele)

Literatur

ARNOLD W. (1990): The evolution of marmot sociality: I. Why disperse late? — Behavioural Ecology and Sociobiology **27**: 239–246.

BIBIKOW D.I. (1996): Die Murmeltiere der Welt. — Die Neue Brehm-Bücherei Bd. **388**. Germany: Westarp Wissenschaften, Magdeburg, Germany.

GOOSSENS B., GRAZIANI L., WAITS L.P., FARAND E., MAGNOLON S., COULON J., BEL M.-C., TABERLET P. & D. ALLAINÉ (1998): Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. — Behav. Ecol. Sociobiol. **43**: 281-288.

KRUCKENHAUSER L. (1995): Untersuchung der genetischen Variation des Alpenmurmeltieres (*M. m. marmota*) mittels DNA-Fingerprinting. — Diplomarbeit, Universität Wien.

KRUCKENHAUSER L., MILLER W. J., PRELEUTHNER M. & W. PINSKER (1997): Differentiation of Alpine marmot populations traced by DNA fingerprinting. — J. Zool. Syst. Evol. Research **35**: 143–149.

NEI M. (1972): Genetic distance between populations. — Amer. Naturalist **106**: 283–292.

PRELEUTHNER M. (1993): Das Alpenmurmeltier (*Marmota m. marmota*, LINNÉ 1758): Verbreitungsgeschichte und genetische Variation in Österreich. — Dissertation, Universität Wien.

PRELEUTHNER M. & W. PINSKER (1993): Depauperated gene pools in *Marmota m. marmota* are caused by an ancient bottle neck: electrophoretic analysis of 15 wild populations from Austria and Switzerland. — In: HARTL G.B. & J. MARKOWSKI: Ecological genetics in mammals I, Acta theriol. **38**, Suppl. 2: 121–139.

PRELEUTHNER M., PINSKER W., KRUCKENHAUSER L., MILLER W.J. & H. PROSL (1995): Alpine marmots in Austria. The present population structure as a result of the postglacial distribution history. — In: HARTL G.B. & J. MARKOWSKI: Ecological genetics in mammals II, Acta theriol. **40**, Suppl. 3: 87–100.

RASSMANN K., ARNOLD W. & D. TAUTZ (1994): Low genetic variability in a natural alpine marmot population (*Marmota marmota*, Sciuridae) revealed by DNA fingerprinting. —Molecular Ecology **3**: 347–353.

SNEATH P.H.A. & R.R. SOKAL (1973): Numerical Taxonomy. — Freeman, San Francisco, USA.

YUHKI N. & S.J. O'BRIEN (1990): DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 836–840.

Anschriften der Verfasser:

Mag. Luise KRUCKENHAUSER
Ao.Univ-Prof. Dr. Wilhelm PINSKER
Institut für Medizinische Biologie, Medizinische Fakultät der Universität Wien,
Währingerstr.10
A-1090 Wien, Austria
e-mail: Luise.Kruckenhauser@univie.ac.at,
Wilhelm.Pinsker@univie.ac.at

Dr. Monika PRELEUTHNER
Konrad-Lorenz-Institut für Vergleichende Verhaltensforschung
Österreichische Akademie der Wissenschaften
Savoyenstr. 1a
A-1160 Wien, Austria
e-mail:
m.preleuthner@klivv.oeaw.ac.at

Dr. Juan HERRERO
Área de Ecología
Facultad de Ciencias
Universidad de Alcalá
E-28871 Alcalá de Henares, Spain
e-mail: ega@net64.es